苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟的生物活性及对其幼虫体内代谢酶活性的影响

曹　溪，朱春亚，张茂新，凌　冰*

（华南农业大学昆虫生态研究室，广州 510642）

摘要：【目的】为研究苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟 *Ostrinina furnacalis* (Güenée)的生物活性和体内相关酶活性的影响。【方法】采用饲料混药法测定了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟生长发育和繁殖的影响，并以生命表的方法评价了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟实验种群增长的控制作用；采用酶标仪测定了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶和磷酸酯酶活性的影响。【结果】用含 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mg/g 浓度苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲喂亚洲玉米螟 3 龄幼虫 3 d，幼虫的存活率明显降低，LC_{50} 为 3.2 mg/g；对幼虫体重增长的抑制作用显著，在 4.0 mg/g 浓度下，第 1, 2 和 3 天体重增长的抑制率分别为 76.87%, 78.24% 和 79.94%，且发育历期明显延长；苦瓜素Ⅰ各浓度处理组中亚洲玉米螟蛹的历期和成虫寿命与对照相比差异不显著，但苦瓜素Ⅰ明显降低了亚洲玉米螟雌成虫的产卵量，4.0 mg/g 浓度下，产卵抑制率高达 73.55%。苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶活性均有明显的抑制作用，处理 24, 48 和 72 h 后，对亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶活性的 IC_{50} 分别为 3.8, 2.9 和 4.9 mg/g；对酸性磷酸酯酶活性的 IC_{50} 分别为 3.1, 2.6 和 1.5 mg/g，对碱性磷酸酯酶活性的 IC_{50} 分别为 3.3 ,1.9 和 3.6 mg/g。【结论】苦瓜素Ⅰ能显著抑制亚洲玉米螟幼虫的生长发育及成虫的生殖力，使其实验种群的增长受到明显控制。苦瓜素Ⅰ抑制亚洲玉米螟幼虫体内海藻糖酶和磷酸酯酶活性是其作用机制之一。

关键词：亚洲玉米螟；苦瓜素Ⅰ；种群控制；海藻糖酶；磷酸酯酶

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)06-0625-09

Bioactivity of momordicin I against *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and its effects on the metabolizing enzyme activities in larval bodies of the moth

CAO Xi, ZHU Chun-Ya, ZHANG Mao-Xin, LING Bing* (Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to explore the effects of momordicin I on the growth and related enzyme activities of the experimental population of *Ostrinina furnacalis* (Güenée). 【Methods】 The effects of momordicin I on the larval weight gain, developmental duration, survival rate and fecundity of *O. furnacalis* were investigated by adding the compound to the artificial diet provided to *O. furnacalis* larvae under laboratory conditions. The life table was used to evaluate the control effects of momordicin I on the experimental population of *O. furnacalis*. The effects of momordicin I on activities of trehalase, alkaline phosphatase and acid phosphatase in *O. furnacalis* larvae were determined. 【Results】 After the 3rd instar larvae of *O. furnacalis* were fed with the artificial diet containing 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg/g momordicin I for 3 d, their survival rates decreased and the LC_{50} value was 3.2 mg/g. Momordicin I had an apparently inhibitory effect on the body weight gain of *O. furnacalis* larvae. After the larvae were fed with the artificial diet containing 4.0 mg/g momordicin I for 1, 2 and 3 d, their body weight gain was inhibited by 76.87%, 78.24% and 79.94%, respectively, and the developmental duration of the treated larvae was significantly longer than that of the control group. The pupal duration

基金项目：国家自然科学基金项目(30871646, 31171849)

作者简介：曹溪，女，1989 年 6 月生，安徽砀山人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态学，E-mail: caoxiaoxi2014@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gzhbling@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-01-22；接受日期 Accepted: 2015-04-26

and adult longevity of the treated larvae were not significantly different from those of the control, while the fecundity of adults in the treatment groups was significantly lower than that of the control. The 4.0 mg/g momordicin I in the artificial diet inhibited the fecundity of adults by 73.55%. Momordicin I in the artificial diet inhibited the activities of trehalase, alkaline and acid phosphatase in *O. furnacalis* larvae. At 24, 48 and 72 h after the larvae were fed with the artificial diet containing momordicin I, the IC_{50} values of the trehalase activity were 3.8, 2.9 and 4.9 mg/g, while those of the alkaline phosphatase activity were 3.1, 2.6 and 1.5 mg/g, and those of the acid phosphatase activity were 3.3, 1.9 and 3.6 mg/g, respectively. 【Conclusion】These results suggest that momordicin I inhibits the population growth and fecundity of *O. furnacalis*, and its inhibition on the activities of trehalase, alkaline and acid phosphatase of larvae may be a major mechanism of action.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; momordicin I; population control; trehalase; phosphatase

苦瓜 *Monordica charantia* L. 属于葫芦科苦瓜属的一种藤蔓植物,其果实既可作为蔬菜又可作为保健品食用(Beloin *et al*., 2005; 李健等, 2005)。苦瓜作为蔬菜在我国有着悠久的栽培历史,在其生长过程中与其他葫芦科作物相比很少被害虫侵害,表现出较强的抗虫性(Chandravadana, 1987; 陈宏等, 1999; 李绍勤等, 2001; 任立云等, 2010)。苦瓜素(momordicins)是从苦瓜叶提取物中分离提纯的葫芦烷型四环三萜类物质,对害虫具有拒食、胃毒、抑制生长发育及忌避产卵等活性(Yasui *et al*., 1998; Mekuria *et al*., 2005; 凌冰等, 2008, 2009)。骆颖等(2012a)报道,苦瓜叶乙酸乙酯萃取物可抑制斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius)实验种群的增长,苦瓜素Ⅰ和Ⅱ是苦瓜叶乙酸乙酯萃取物的主要活性成分,分别占总成分的16.51%和14.37%。已有的研究表明,苦瓜素Ⅰ和苦瓜素Ⅱ对不同昆虫的生物活性有所差异,苦瓜素Ⅱ对东方粘虫 *Pseudaletia separata* (Walker)幼虫和红南瓜甲虫 *Raphidopala foveicollis* (Lucas)成虫有强烈的拒食活性(Chandravadana *et al*., 1983; Yasui *et al*., 1998);对斜纹夜蛾和小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)幼虫的拒食活性明显高于苦瓜素Ⅰ(Yasui *et al*., 1998; 凌冰等, 2008)。但是,苦瓜素Ⅰ对黑足黑守瓜 *Aulacohora nigripennis* (Motschulsky)成虫有强烈的拒食作用(Abe and Matsuda, 2000),对三叶草斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* (Burgess)成虫产卵有显著的抑制作用(Mekuria *et al*., 2005)。苦瓜素Ⅰ对小菜蛾幼虫的拒食作用稍弱于苦瓜素Ⅱ,但对其体重增长的抑制作用却与苦瓜素Ⅱ相当(凌冰等, 2008)。

亚洲玉米螟 *Ostrinina furnacalis* (Güenée)是我国玉米的主要害虫,严重影响着玉米产区的玉米产量和质量(王振营等, 2000)。朱春亚等(2014)测定了苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对亚洲玉米螟幼虫体内代谢酶的影响,结果表明,苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对其海藻糖酶和磷酸酯酶活性有较强的抑制作用,对羧酸酯酶活性的影响则表现为先抑制后诱导再恢复的趋势,对谷胱甘肽-S-转移酶活性表现出明显的诱导作用。苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟的生物活性及其作用机制的系统研究尚未见报道。为此,我们系统研究了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟生长发育、存活率及生殖力的影响,并用生命表的方法评价了其对亚洲玉米螟实验种群增长的控制作用。同时,测定了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟幼虫体内海藻糖酶和磷酸酯酶活性的抑制作用,为进一步揭示苦瓜抗虫的化学机制以及开发和利用苦瓜素类化合物防治亚洲玉米螟提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟是本实验室长期继代饲养的敏感品系,在光周期 14L:10D、温度 27±2℃、相对湿度 60%~70% 的条件下,用人工饲料(陈其津等, 2000)饲养。

1.2 供试药剂和试剂

苦瓜素Ⅰ(纯度97%)由本课题组从苦瓜叶乙酸乙酯萃取物中分离提纯获得,牛血清蛋白和海藻糖(Sigma 公司),对硝基苯基磷酸二钠和对硝基酚(Amresco 公司),考马斯亮蓝 G250(北京鼎国生物技术有限责任公司),丙酮(化学纯)(天津市精科精细化工厂)。

1.3 生物活性测定方法

1.3.1 苦瓜素Ⅰ混合饲料的配制:称取一定量苦瓜素Ⅰ,用丙酮溶解配制成 1.25, 2.5, 5.0, 10 和 20 mg/mL的药液,吸取不同浓度的药液 2 mL,分别加入到 10 g 人工饲料中(骆颖等, 2012a),搅拌均

匀，放置在通风柜内让丙酮完全挥发后备用。各处理混合饲料的含药剂浓度为 0.25，0.5，1.0，2.0 和 4.0 mg/g，以加入同样剂量丙酮的饲料作为对照处理。

1.3.2 对幼虫生长发育的抑制作用：参照骆颖等(2012a)方法，略有改动。取 24 h 内产下的亚洲玉米螟卵块，置于培养皿中，静待孵化，统计孵化率。将 12 h 内孵化的幼虫接入到装有新鲜饲料的培养皿中，每 12 h 观察记录龄期变化和死亡率，直至生长到 3 龄幼虫。选取发育正常、个体大小一致的 3 龄幼虫(幼虫头部已呈黑褐色)为试虫，饥饿 4 h。将 20～30 头试虫接入到装有含苦瓜素Ⅰ的人工饲料的培养皿(直径为 9 cm)内，用保鲜膜封口并扎适量小孔，饲养 3 d。将存活的试虫转入果冻盒(直径为 4 cm，高为 4 cm)中，以不含药剂的人工饲料单头饲养至化蛹。定期更换饲料，每 12 h 检查试虫死亡情况和龄期变化，并分别于处理后的 1，2 和 3 d 称重。每个浓度重复 3 次。按公式(1)和(2)计算苦瓜素Ⅰ对幼虫体重增长的抑制率。

$$\text{体重增加量} = \text{每时段幼虫平均体重} - \text{幼虫初始平均体重} \quad (1)$$

$$\text{体重增长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组体重增加量} - \text{处理组体重增加量}}{\text{对照组体重增加量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 对成虫生殖力影响的测定：待成虫羽化后，将各处理的成虫分别雌雄配对，放入自制的圆柱形产卵装置(直径 8 cm，高 7 cm)中，喂以 10% 的蜂蜜水补充营养，记录每头雌虫每天的产卵量直至死亡。当处理组试虫与对照组试虫产卵量差异达显著水平时，按公式(3)计算苦瓜素Ⅰ对成虫产卵的抑制率。根据公式(4)计算出内禀增长率(r_m)和周限增长率(λ)。

$$\text{产卵抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组产卵量} - \text{处理组产卵量}}{\text{对照组产卵量}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{内禀增长率}\ r_m = \frac{\ln R_0}{T};\text{周限增长率}\ \lambda = e^{r_m} \quad (4)$$

1.3.4 对实验种群增长抑制作用的评价：按 1.3.2 节和 1.3.3 节方法，以各虫态存活率和生殖力等数据组建了用含不同浓度苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲养的亚洲玉米螟实验种群生命表，并按公式(5)计算出不同浓度苦瓜素Ⅰ处理组与对照组亚洲玉米螟的种群趋势指数(I)。

$$I = S_E S_{1-2} S_{3-5} S_P P_{♀} F P_F \quad (5)$$

式中，S_E 表示卵存活率，S_{1-2} 和 S_{3-5} 分别表示 1－2 龄和 3－5 龄幼虫的存活率，S_P 表示蛹存活率，$P_{♀}$ 表示雌虫概率，F 表示设定的标准卵量，P_F 表示达标准卵量的概率。

1.4 对幼虫体内代谢酶活力的影响

1.4.1 试虫处理及酶液的制备：按 1.3.1 节的方法配制含有苦瓜素Ⅰ的浓度分别为 0.5，1.0，2.0，4.0和 8.0 mg/g 的混合人工饲料，按照 1.3.2 节的方法处理试虫。于处理后 24，48 和 72 h，每处理挑取幼虫 15 头为一组，放入预冷的玻璃匀浆器中，加入 5 mL pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液在冰浴条件下匀浆。匀浆液在 4 000 r/min 4℃ 条件下离心 10 min，取上清液作酶源，－20℃ 保存待测。以不含苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲养的幼虫为对照，每个浓度 3 个重复。

1.4.2 海藻糖酶活性的测定：参照钟国华等(2000)的方法。用 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液(pH 5.8) 5 mL 提取酶液。取 0.25 mL 酶液加入 0.5 mL 2 mmol/L海藻糖标准液中混匀，37℃ 水浴 60 min。取 1 mL 反应液，加入 3,5-二硝基水杨酸试剂 2 mL，混匀，沸水浴加热 5 min，冷却后用 iMark 酶标仪测定其 550 nm 处的光密度值(OD 值)。以考马斯亮蓝法测定蛋白质含量，根据标准曲线方程计算葡萄糖含量，酶活力以 μmol/mg pro·min 表示。

1.4.3 磷酸酯酶活力的测定：参照 Bessey 等(1946)的方法。酸性磷酸酯酶活力的测定，取酶液 0.2 mL 加入到 2.3 mL 的 0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.6)中，再加入 0.0075 mol/L 对硝基苯基磷酸二钠 0.5 mL，37℃ 水浴 30 min 后加入 2.0 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液混匀，测其400 nm 处的 OD 值。碱性磷酸酯酶活力的测定是用 0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH 10.0)代替 0.2 mol/L 醋酸缓冲液，其他均与酸性磷酸酯酶测定方法相同。用对-硝基苯酚作标准曲线计算酶活力。

1.5 可溶性蛋白含量测定

采用 Bradford(1976)法测定，以牛血清蛋白为标准蛋白，测定可溶性蛋白含量。实验求得标准曲线方程为 $Y = 0.0693X + 0.0044$，$R^2 = 0.9968$。

1.6 数据分析

实验数据的平均数据均以平均值 ± 标准误表示，并用邓肯氏新复极差法($P < 0.05$)检验化合物不同浓度处理间的差异显著性(SAS 9.0)。

2 结果

2.1 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫存活率和蛹存活率的影响

用含苦瓜素 I 的人工饲料饲喂亚洲玉米螟 3 龄幼虫后,对其幼虫的存活率有明显的影响(表 1)。由表 1 数据可以看出,随着苦瓜素 I 浓度的增加,存活率逐渐降低,表现出明显的毒杀作用。苦瓜素 I 对幼虫存活率的毒力回归方程为 $y = 5.3330 + 0.6788x$ ($r = 0.9867$),LC_{50} 为 3.2 mg/g(95% 置信区间为 1.8 ~ 5.9 mg/g)。与对照相比,苦瓜素 I 处理对亚洲玉米螟蛹存活率的影响总的来说差异不显著($F_{5,17} = 1.78$, $P > 0.05$)。浓度为 1.0 mg/g 处理组蛹的存活率与对照差异明显,但与其他浓度间的差异却不显著,这可能是由于该处理重复间的误差所引起。

表 1 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫和蛹存活率的影响

Table 1 Influence of momordicin I on the survival rates of *Ostrinina furnacalis* larvae and pupae

苦瓜素 I 浓度(mg/g) Momordicin I concentration	幼虫存活率(%) Larval survival rate	蛹存活率(%) Pupal survival rate
0(CK)	93.94 ± 4.01 a	88.67 ± 5.51 a
0.25	78.90 ± 2.68 b	77.75 ± 2.54 ab
0.5	68.49 ± 0.91 c	85.12 ± 9.16 ab
1.0	62.64 ± 1.33 cd	76.93 ± 4.14 b
2.0	57.95 ± 1.88 d	82.18 ± 4.93 ab
4.0	46.88 ± 1.89 e	80.47 ± 6.40 ab

表中数据为平均值 ± 标准误;同列数据后字母不同者表示差异显著(邓肯氏新复极差法, $P < 0.05$)。表 2 同。Data in the table denote mean ± *SE*, and those followed by different letters within a column indicate significant difference (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$). The same for Table 2.

2.2 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫体重增长的抑制作用

不同浓度的苦瓜素 I 对亚洲玉米螟 3 龄幼虫体重增长的抑制作用见图 1 。从图 1 可以看出,亚洲玉米螟幼虫取食含不同浓度苦瓜素 I 的人工饲料后,其幼虫每天的体重增加量均明显低于对照组。处理后第 2 和 3 天,随着苦瓜素 I 浓度的增加其体重增加抑制率明显增强,表现出明显的浓度效应。在较高浓度(4.0 mg/g)下,苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫第 1, 2 和 3 天体重增长的抑制率分别为 76.87%, 78.24% 和 79.94%。

2.3 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫和蛹发育历期的影响

用含不同浓度苦瓜素 I 的人工饲料饲喂亚洲玉米螟 3 龄幼虫后,各处理组 3 - 5 龄幼虫的发育历期均比对照组延长,苦瓜素 I 浓度越高其幼虫的发育历期就越长($F = 10.42$, $P = 0.005$),但对蛹的发育历期没有影响($F = 0.71$, $P > 0.5$)。高浓度(4.0 mg/g)处理组 3 - 5 龄幼虫的发育历期比对照延长了 2.42 d。实验过程中发现,高浓度(4.0 mg/g)苦瓜素 I 处理组有些幼虫在观察期内(30 d)一直保持幼虫状态;还有个别幼虫出现畸形蛹现象,这表明苦瓜素 I 对亚洲玉米螟发育有明显的滞后抑制作用。

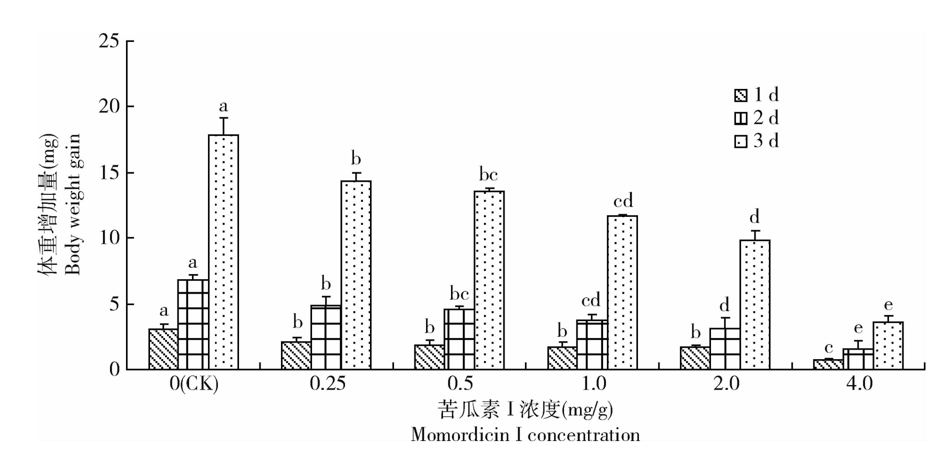


图 1 苦瓜素 I 对亚洲玉米螟 3 龄幼虫体重增长的影响

Fig. 1 Effect of momordicin I on the body weight gain of the 3rd instar larvae of *Ostrinina furnacalis*

图中数据为平均值 ± 标准误;柱上字母不同者表示同一天不同浓度处理间的差异显著(邓肯氏新复极差法, $P < 0.05$)。Data are represented as means ± *SE*, and different letters above bars indicate significant difference among different concentrations at the same day after treatment (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$).

表 2　苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫和蛹发育历期的影响

Table 2　Effects of momordicin Ⅰ on the developmental duration of *Ostrinina furnacalis* larvae and pupae

苦瓜素 I 浓度(mg/g) Momordicin I concentration	幼虫历期 Larval duration (d) 3 龄 3rd instar	4 龄 4th instar	5 龄 5th instar	3－5 龄 3rd－5th instar	蛹期(d) Pupal duration
0(CK)	1.72 ±0.04 a	2.15 ±0.02 a	4.93 ±0.01 a	8.97 ±0.18 a	6.28 ±0.19 a
0.25	1.82 ±0.05 ab	2.45 ±0.05 b	5.29 ±0.09 bc	9.55 ±0.19 ab	6.12 ±0.09 a
0.5	1.75 ±0.02 ab	2.60 ±0.07 bc	4.96 ±0.14 ab	9.79 ±0.39 b	6.15 ±0.24 a
1.0	1.78 ±0.02 ab	2.83 ±0.05 c	5.43 ±0.03 c	10.04 ±0.09 b	5.94 ±0.10 a
2.0	1.88 ±0.01 b	3.13 ±0.10 d	5.35 ±0.06 c	10.19 ±0.11 b	6.40 ±0.11 a
4.0	2.02 ±0.06 c	4.08 ±0.14 e	5.76 ±0.18 d	11.39 ±0.36 c	6.02 ±0.32 a

2.4　苦瓜素 I 对亚洲玉米螟成虫生殖力的影响

用 0.25 ~4.0 mg/g 浓度范围的苦瓜素 Ⅰ 人工饲料饲喂亚洲玉米螟 3 龄幼虫后，对其成虫寿命无明显影响($F_{5,17}=1.32$, $P>0.5$)，但对成虫的生殖力有显著的抑制作用($F_{5,17}=11.86$, $P=0.0003$)(表3)。1.0 和 2.0 mg/g 浓度处理组的产卵抑制率分别为 30.34% 和 45.38%，4.0 mg/g 浓度处理组的产卵抑制率高达 73.55%。苦瓜素 Ⅰ 对亚洲玉米螟成虫产卵量的 IC_{50} 为 1.9 mg/g($y=6.1336+1.5566x$, $r=0.9790$, 95% 置信区间为 1.5 ~2.3 mg/g)。2.0 和 4.0 mg/g 浓度处理组的世代净生殖率(Ro)显著下降，与对照相比分别降低了 78.41% 和 89.01%。内禀增长率(r_m)分别比对照降低了 32.13% 和 45.51%，说明苦瓜素 I 对成虫的生殖力有强烈的抑制作用。

表 3　不同浓度苦瓜素 I 对亚洲玉米螟成虫生殖力的影响

Table 3　Effect of momordicin Ⅰ on the fecundity of *Ostrinina furnacalis* adults

苦瓜素 I 浓度 (mg/g) Momordicin Ⅰ concentration	成虫寿命(d) Adult longevity	平均单雌产卵量(粒) Average number of eggs laid per female	世代历期 Generation period (T)	净生殖力 Net reproduction (R_o)	内禀增长率 Intrinsic rate of increase (r_m)	周限增长率 Finite rate of increase (λ)
0(CK)	8.67 ±0.06 a	505.33 ±53.54 a	32.17	201.12	0.16	1.18
0.25	8.87 ±0.06 a	466.67 ±40.82 ab	32.79	131.01	0.15	1.16
0.5	8.67 ±0.09 a	380.67 ±10.68 abc	32.86	98.53	0.14	1.15
1.0	8.83 ±0.09 a	352.00 ±25.01 bc	33.06	81.61	0.13	1.14
2.0	8.84 ±0.10 a	276.00 ±51.32 c	33.68	42.83	0.11	1.12
4.0	8.76 ±0.06 a	133.67 ±36.06 d	34.42	22.09	0.09	1.09

表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误；同列数据后字母不同者表示差异显著(邓肯氏新复极差法, $P<0.05$)。表 4 同。Data in the table are means ± *SE* of three replicates, and different letters following the data within a column indicate significant difference (Duncan's multiple range test, $P<0.05$). The same for Table 4.

2.5　苦瓜素 I 对亚洲玉米螟实验种群增长的影响

参考庞雄飞和梁广文(1995)的方法，以亚洲玉米螟实验种群各个虫态的存活率组建了用含不同浓度苦瓜素 Ⅰ 的人工饲料饲喂后亚洲玉米螟的实验种群生命表(表 4)。从表 4 可以看出，苦瓜素 Ⅰ 各浓度处理对亚洲玉米螟实验种群的增长有很强的抑制作用，其中，3－5 龄幼虫的存活率及雌虫达到标准卵量比率的下降是苦瓜素 Ⅰ 对亚洲玉米螟种群增长抑制的主要原因。随着苦瓜素 Ⅰ 浓度的提高，其种群趋势指数愈来愈小。在 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mg/g 浓度下，亚洲玉米螟实验种群的增长分别比对照组降低了 34.88%, 51.03%, 59.40%, 78.71% 和 89.02%。

2.6　苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶活性的抑制作用

苦瓜素 Ⅰ 对亚洲玉米螟幼虫体内海藻糖酶活性有显著的抑制作用(图 2)。取食含苦瓜素I的人工饲料 24, 48 和 72 h，各浓度处理组海藻糖酶相对活力均显著低于对照(24 h: $F_{5,17}=60.97$, $P<0.0001$; 48 h: $F_{5,17}=148.49$, $P<0.0001$; 72 h: $F_{5,17}=264.29$, $P<0.0001$)，且随着浓度的增加，抑制作用逐渐增强。苦瓜素I处理 24, 48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 3.8, 2.9 和 4.9 mg/g，其中以 48 h 的抑制作用最强。

2.7　苦瓜素 I 对亚洲玉米螟幼虫磷酸酯酶活性的抑制作用

取食含不同浓度苦瓜素 Ⅰ 的人工饲料后亚洲玉

表4 取食含不同浓度苦瓜素I的人工饲料后亚洲玉米螟的实验种群生命表

Table 4 Life table of the experimental population of *Ostrinina furnacalis* after fed with the artificial diet containing different concentrations of momordicin I

虫期 Developmental stage	存活率 Survival rate					
	0(CK)	0.25 mg/g	0.5 mg/g	1.0 mg/g	2.0 mg/g	4.0 mg/g
卵 Egg	0.92 ±0.07	0.92 ±0.07	0.92 ±0.07	0.92 ±0.07	0.92 ±0.07	0.92 ±0.07
1-2 龄幼虫 1st-2nd instar larva	0.89 ±0.02	0.89 ±0.02	0.89 ±0.02	0.89 ±0.02	0.89 ±0.02	0.89 ±0.02
3-5 龄幼虫 3rd-5th instar larva	0.94 ±0.04	0.79 ±0.03	0.68 ±0.01	0.63 ±0.01	0.58 ±0.02	0.47 ±0.02
蛹 Pupa	0.89 ±0.06	0.78 ±0.03	0.88 ±0.09	0.77 ±0.04	0.71 ±0.05	0.80 ±0.06
成虫 Adult 产卵达到标准卵量的比率(P_F) Proportion of F that can be achieved by females	0.85	0.79	0.64	0.59	0.46	0.23
雌成虫比率 Female ratio	0.58	0.56	0.52	0.58	0.46	0.52
种群趋势指数 Population trend index (I)	199.40 ±14.74	131.69 ±7.75	98.53 ±2.28	81.36 ±3.00	43.06 ±2.42	21.92 ±0.74

标准卵量(F)是实验中观察到的单头雌虫最大的产卵量,为594粒/雌。F represents the observed maximal number of eggs laid per female, equal to 594.

米螟幼虫体内酸性和碱性磷酸酯酶的相对活力见图3。由图3可以看出,苦瓜素Ⅰ不同浓度处理对亚洲玉米螟幼虫酸性和碱性磷酸酯酶活性均有明显的抑制作用。从图3(A)可以看出,除了低浓度0.5 mg/g处理外,其他浓度处理组酸性磷酸酯酶的相对活力均明显低于对照组(24 h: $F_{5,17}$ = 77.78, P < 0.0001; 48 h: $F_{5,17}$ = 236.7, P < 0.0001; 72 h: $F_{5,17}$ = 324.92, P < 0.0001)。随着苦瓜素Ⅰ浓度的增加,酸性磷酸酯酶活力逐渐降低,且随处理时间的延长,抑制酶活力的 IC_{50} 也逐渐降低。苦瓜素Ⅰ处理24, 48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 3.1, 2.6 和 1.5 mg/g,以72 h的抑制作用最强。

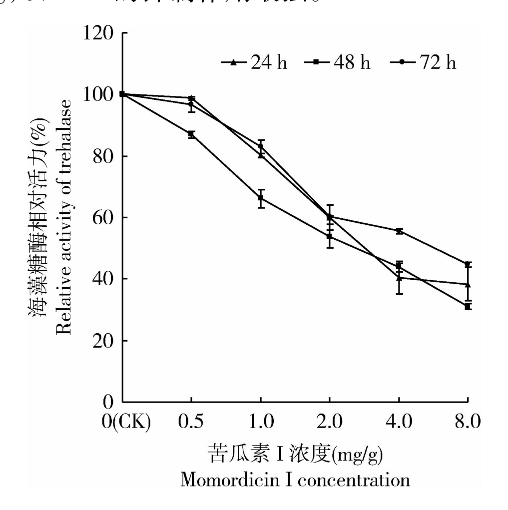


图2 取食含不同浓度苦瓜素Ⅰ的人工饲料后亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶的相对活力

Fig. 2 Relative activity of trehalase in *Ostrinina furnacalis* larvae fed with the artificial diet containing different concentrations of momordicin I

苦瓜素Ⅰ不同浓度处理对碱性磷酸酯酶活性的抑制作用趋势与酸性磷酸酯酶相似,由图3(B)可以看出,各浓度处理组碱性磷酸酯酶的相对活力均明显低于对照组(24 h: $F_{5,17}$ = 51.52, P < 0.0001; 48 h: $F_{5,17}$ = 1764.88, P < 0.0001; 72 h: $F_{5,17}$ = 358.56, P < 0.0001),且随着苦瓜素Ⅰ浓度的增加,碱性磷酸酯酶的相对活力逐渐降低。苦瓜素Ⅰ处理24, 48 和 72 h 对亚洲玉米螟幼虫碱性磷酸酯酶活性的 IC_{50} 分别为3.3, 1.9 和 3.6 mg/g,以48 h的抑制作用最强。

3 结论与讨论

本研究以亚洲玉米螟为研究对象,测定了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟幼虫存活率、体重增长和发育历期以及对蛹存活率和成虫生殖力的影响。研究表明,用含苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲喂亚洲玉米螟3龄幼虫3 d后,其幼虫存活率显著低于对照组,幼虫体重的增长也受到明显的抑制,发育历期明显延长。这与凌冰等(2008)报道的苦瓜素Ⅰ对小菜蛾幼虫体重的增长及存活率有明显的抑制作用相一致。Luo 等(2013)用含苦瓜素Ⅱ的人工饲料饲喂亚洲玉米螟2龄幼虫后,明显抑制了其幼虫的存活率和成虫的产卵量,其实验种群趋势指数比对照显著降低。本研究结果表明,用含苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲喂亚洲玉米螟3龄幼虫后,雌成虫的产卵量显著减低,内禀增长率受到明显的抑制,对亚洲玉米螟实验种群的增长有显著的控制效果。苦瓜素Ⅰ和苦瓜素Ⅱ是两个分子结构极其相似的化合物,对害虫的拒食作用存在一定的差异(Yasui *et al.*, 1998; 凌冰等, 2008),但对小菜蛾幼虫存活率的影响差异不显著(凌冰等, 2008)。有关这两种化合物对亚洲玉米螟生物活性的比较研究未见报道。

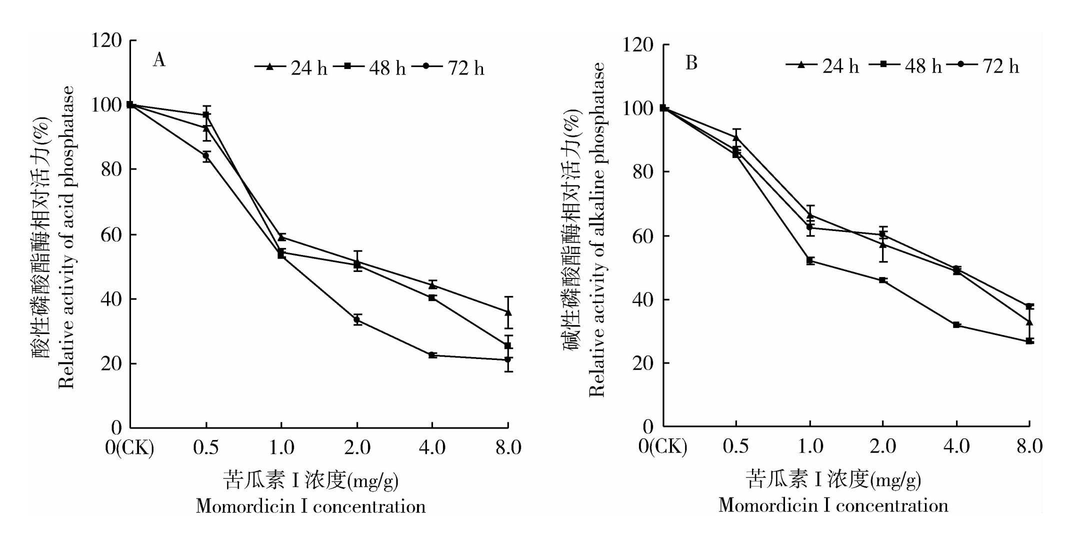


图 3　取食含不同浓度苦瓜素Ⅰ人工饲料后亚洲玉米螟酸性磷酸酯酶(A)和碱性磷酸酯酶(B)的相对活力

Fig. 3　Relative activity of acid phosphatase (A) and alkaline phosphatase (B) in *Ostrinina furnacalis* larvae fed with the artificial diet containing different concentrations of momordicin Ⅰ

近年来苦瓜叶提取物及苦瓜素类化合物的作用机制研究报道渐多。骆颖等(2012b)报道认为苦瓜叶乙酸乙酯萃取物可以抑制斜纹夜蛾幼虫中肠蛋白酶和淀粉酶的活性,苦瓜素Ⅱ对斜纹夜蛾幼虫中肠蛋白酶活性有显著的抑制作用。朱春亚等(2014)的研究结果表明,苦瓜叶乙酸乙酯萃取物可显著抑制亚洲玉米螟幼虫体内海藻糖酶和磷酸酯酶的活性。刘欢等(2014)研究了苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾卵巢细胞(SL-1)的影响,结果表明,苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL-1 有明显的增殖抑制作用,可诱导 SL-1 细胞形态发生畸变,细胞核发生偏移甚至消失,抑制了细胞对葡萄糖的吸收。这些报道对于深入了解苦瓜素的作用机理提供了很好的参考作用。但苦瓜素Ⅰ对昆虫的作用机制研究尚未见报道。本研究结果表明,亚洲玉米螟幼虫取食了含有苦瓜素Ⅰ的人工饲料后,其体内海藻糖酶和磷酸酯酶活性显著降低,随着苦瓜素Ⅰ浓度的增加,抑制作用明显增强。海藻糖酶在昆虫的能量代谢、生长发育及生殖腺和生殖细胞发育等方面起重要作用(钟国华等, 2000)。Wegener 等(2003)的研究发现,向昆虫体内注射海藻糖酶抑制剂可使昆虫水解海藻糖功能受限,引起昆虫低血糖症,致使昆虫生长发育受阻,运动功能障碍甚至死亡(于彩虹等, 2008)。张倩等(2012)的研究结果表明,当灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén)的海藻糖酶基因的表达被抑制后,其海藻糖酶活力降低,能显著抑制灰飞虱的生长发育,体重减轻,死亡率提高。最近的研究结果发现,海藻糖酶主要通过调控几丁质合成途径来控制昆虫的蜕皮过程,当海藻糖酶 Treh 基因被抑制后,几丁质合成酶的表达也同时被抑制,引起昆虫发育受阻,最终不能完成蜕皮而死亡(唐斌等, 2012)。苦瓜素Ⅰ可能因降低了亚洲玉米螟海藻糖酶的活性,从而抑制了几丁质合成酶的活性,使幼虫蜕皮受到阻碍,引起发育历期延迟,甚至出现“永久性”幼虫以及畸形蛹。磷酸酯酶不仅在昆虫体内核苷酸、磷蛋白和磷脂的代谢中起重要作用,而且对外源化合物的解毒代谢起重要作用(徐艳聆等, 2007)。苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对亚洲玉米螟幼虫生长发育的抑制作用与其体内海藻糖酶和磷酸酯酶活力被抑制有关(朱春亚等, 2014)。用含 0.2% 苦瓜叶乙酸乙酯萃取物的人工饲料饲喂亚洲玉米螟幼虫 72 h,对其海藻糖酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶活力的抑制率分别为 30.1%, 38% 和 23.1% (朱春亚等, 2014)。与之相比较,含相同浓度苦瓜素Ⅰ的人工饲料饲喂亚洲玉米螟幼虫 72 h,对亚洲玉米螟幼虫海藻糖酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶活性的抑制率分别达到 39.7%, 66.5% 和 39.8%。说明苦瓜素Ⅰ对这 3 种酶的抑制作用更强,这进一步证明苦瓜素Ⅰ是苦瓜叶乙酸乙酯萃取物中的主要活性物质。苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟幼虫体内海藻糖酶和磷酸酯酶活性的抑制作用可能是其导致昆虫体重增长和生长发育受阻的原因之一。

海藻糖酶不仅存在于昆虫幼虫消化道和血淋巴中影响其正常发育、蜕皮和变态,而且也存在于成虫飞行肌肉相关组织和卵巢组织中,与其飞行肌肉和生殖细胞发育密切相关(Becker *et al*., 1996; 池明

姬和冯化成, 2003; 张文庆等, 2011)。井岗羟胺 A (validoxylamine A, VAA)是一种海藻糖酶的高效抑制剂。据报道,用 VAA 注射到蜚蠊雌成虫和亚洲飞蝗 *Locusta migratoria* (L.)蛹体内,可明显抑制其卵巢内海藻糖酶的活性,使卵壳不能完全硬化,产卵量明显减少,卵的孵化率降低(池明姬和冯化成, 2003)。苦瓜素Ⅰ处理后对亚洲玉米螟成虫生殖力的影响是否与幼虫海藻糖酶被抑制相关有待进一步研究。

近年来关于植物源杀虫剂的研究逐渐增多,植物源杀虫剂因具有不污染环境,对人畜等非靶标生物安全,害虫不易产生抗性等特点,越来越受到人们的重视。本文结果不仅明确了苦瓜素Ⅰ对亚洲玉米螟的生物活性,而且初步研究了它对昆虫的作用机制。为开发和研制新型杀虫剂提供了科学依据。

参考文献(References)

Abe M, Matsuda K, 2000. Feeding deterrents from *Momordica charantia* leaves to cucurbitaceous feeding beetle species. *Applied Entomology and Zoology*, 35(1): 143 – 149.

Becker A, Schlder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5): 433 – 439.

Beloin N, Gbeassor M, Akpagana K, Hudson J, de Soussa K, Koumaglo K, Arnason JT, 2005. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1 – 2): 49 – 55.

Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ, 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 164: 321 – 329.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1 – 2): 248 – 254.

Chandravadana MV, 1987. Identification of triterpenoid feeding deterrent of red pumpkin beetles (*Aulacophora foveicollis*) from *Momordica charantia*. *Journal of Chemical Ecology*, 13(7): 1689 – 1694.

Chandravadana MV, Pai AB, 1983. Triterpenoid feeding deterrent of *Raphidopalpa foveicollis* L. (red pumpkin beetles) from *Momordica charantia* L. *Current Science*, 52(2): 87 – 88.

Chen H, Jing Y, Dong H, Peng YK, 1999. Effects of extracts of balasm pear leaves on life and behavior of *Plutella xylostella* L. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 14(4): 117 – 121. [陈宏, 靳阳, 董华, 彭永康, 1999. 不同浓度苦瓜叶片提取液对小菜蛾幼虫行为及存活的影响. 华北农学报, 14(4): 117 – 121]

Chen QJ, Li GH, Pang Y, 2000. A simple artificial diet for mass rearing of some noctuid species. *Entomological Knowledge*, 37(6) : 325 – 327. [陈其津, 李广宏, 庞义, 2000. 饲养五种夜蛾科昆虫的一种简易人工饲料. 昆虫知识, 37(6): 325 – 327]

Chi MJ, Feng HC, 2003. Trehalase – the target of pesticides. *World Pesticides*, 25(5): 34 – 36. [池明姬, 冯化成, 2003. 海藻糖酶——杀虫剂的作用靶标. 世界农药, 25(5): 34 – 36]

Li J, Zhang LW, Yan EZ, An GJ, 2005. The research progress on momordicoside. *Food Research and Development*, 26(3): 21 – 24. [李健, 张令文, 闫恩志, 安广军, 2005. 苦瓜皂甙的研究进展. 食品研究与开发, 26(3): 21 – 24]

Li SQ, Deng WX, Zhang QD, 2001. The killing action and growth influence of *Momordica charantia* extracts on *Liriomyza sativae*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 20(6): 539 – 543. [李绍勤, 邓望喜, 张求东, 2001. 苦瓜叶片提取液对美洲斑潜蝇杀虫作用与生长发育的影响. 华中农业大学学报, 20(6): 539 – 543]

Ling B, Wang GC, Ya J, Zhang MX, Liang GW, 2008. Studies on antifeeding activity and active ingredients against *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* leaves. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(10): 3116 – 3122. [凌冰, 王国才, 轧霁, 张茂新, 梁广文, 2008. 苦瓜叶提取物对小菜蛾的拒食活性及有效成分研究. 中国农业科学, 41(10): 3116 – 3122]

Ling B, Xiang YL, Wang GC, Chen SH, Zhang MX, 2009. Antifeedant and antioviposition activities of *Momordica charantia* leaf ethanol extract against *Liriomyza sativae*. *Chinese Journal Applied Ecology*, 20(4): 836 – 842. [凌冰, 向亚林, 王国才, 陈少华, 张茂新, 2009. 苦瓜叶提取物对美洲斑潜蝇取食和产卵行为的抑制作用. 应用生态学报, 20(4): 836 – 842]

Liu H, Zhu CY, Zhang MX, Ling B, 2014. Bioactivity of extracts of *Momordica charantia* leaves against *Ostrinina furnacalis* and their cytotoxicity to *Spodoptera litura* ovary cells. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 212 – 220. [刘欢, 朱春亚, 张茂新, 凌冰, 2014. 苦瓜叶提取物对亚洲玉米螟的生物活性及对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒力. 应用昆虫学报, 51(1): 212 – 220]

Luo Y, Guo ZJ, Wang GC, Cao X, Zhang MX, Ling B, 2013. Inhibitory effects of momordicin Ⅱ on an experimental population of *Ostrinia furnacalis* (Güenée) and *Spodoptera litura* (Fabricius). In: Proceedings of 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering, Hong Kong. 221 – 227.

Luo Y, Ling B, Xie JF, Zhang MX, 2012a. Inhibition effects of *Momordica charantia* leaves on the experimental population of *Spodoptera litura*. *Acta Ecologica Sinica*, 32(13): 4173 – 4180. [骆颖, 凌冰, 谢杰峰, 张茂新, 2012a. 苦瓜叶乙酸乙酯提取物对斜纹夜蛾实验种群的抑制作用. 生态学报, 32(13): 4173 – 4180]

Luo Y, Zhang MX, Ling B, 2012b. Effects of ethyl acetate extracts of *Momordica charantia* leaves on digestive enzymes of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Environmental Entomology*, 34(3): 289 – 294. [骆颖, 张茂新, 凌冰, 2012b. 苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对斜纹夜蛾消化酶活性的影响. 环境昆虫学报, 34(3): 289 – 294]

Mekuria DB, Kashiwagi T, Tebayashi S, Kim C, 2005. Cucurbitane triterpenoid oviposition deterrent from *Momordica charantia* to the leafminer, *Liriomyza trifolii*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 69(9): 1706 – 1710.

Pang XF, Liang GW, 1995. Pest Population System Control. Guangdong Science and Technology Press, Guangzhou. [庞雄飞, 梁广文,

1995. 害虫种群系统的控制. 广州：广东科技出版社］

Ren LY, Zhang Y, Wei DD, Qin AZ, 2010. Primary research on the chemical resistance of the extracts from *Momordica charantia* L. to *Aulacophora lewisii* Baly adult. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 38(3): 1306 – 1308.［任立云，张跃，韦达东，覃爱枝，2010. 苦瓜提取物对黄足黑守瓜的化学抗虫性初步研究. 安徽农业科学，38(3)：1306 – 1308］

Tang B, Wei P, Chen J, Wang SG, Zhang WQ, 2012. Progress in gene features and functions of insect trehalase. *Acta Entomologica Sinica*, 55(11): 1315 – 1321.［唐斌，魏苹，陈洁，王世贵，张文庆，2012. 昆虫海藻糖酶的基因特性及功能研究进展. 昆虫学报，55(11)：1315 – 1321］

Wang ZY, Lu X, He KL, Zhou DR, 2000. Review of history, present situation and prospect of the Asian corn borer research in China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 31(5): 402 – 412.［王振营，鲁新，何康来，周大荣，2000. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望. 沈阳农业大学学报，31(5)：402 – 412］

Wegener G, Tschiedel V, Schlöder P, Ando O, 2003. The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *Journal of Experimental Biology*, 206(7): 1233 – 1240.

Xu YL, Wang ZY, He KL, Bai SX, Zhao RZ, 2007. Effect of transgenic Bt corn expressing CrylAb toxin on the phosphatase activity of larvae of the Asian corn borer. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35(3): 630 – 631.［徐艳聆，王振营，何康来，白树雄，赵润洲，2007. 转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟幼虫磷酸酯酶活性的影响. 安徽农业科学，35(3)：630 – 631］

Yasui H, Kato A, Yazawa M, 1998. Antifeedants to armyworms, *Spodoptera litura* and *Pseudaletia separata*, from bitter gourd leaves, *Momordia charantia*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(5): 803 – 813.

Yu CH, Lu D, Lin RH, Wang XJ, Jiang H, Zhao F, 2008. Trehalose – the blood sugar in insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 832 – 837.［于彩虹，卢丹，林荣华，王晓军，姜辉，赵飞，2008. 海藻糖——昆虫的血糖. 昆虫知识，45(5)：832 – 837］

Zhang Q, Lu DH, Pu J, Wu M, Han ZJ, 2012. Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(8): 911 – 920.［张倩，鲁鼎浩，蒲建，吴敏，韩召军，2012. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应. 昆虫学报，55(8)：911 – 920］

Zhang WQ, Chen XF, Tang B, Tian HG, Chen J, Yao Q, 2011. Insect chitin biosynthesis and its regulation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 475 – 479.［张文庆，陈晓菲，唐斌，田宏刚，陈洁，姚琼，2011. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿. 应用昆虫学报，48(2)：475 – 479］

Zhong GH, Hu MY, Lin JT, Zhou LJ, 2000. Effects of rhodojaponin-III on trehalose reserves and activity of trehalase in the larvae of *Pieris rapae*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 19(2): 119 – 123.［钟国华，胡美英，林进添，周利娟，2000. 闹羊花素-III 对菜青虫海藻糖含量及海藻糖酶活性的影响. 华中农业大学学报，19(2)：119 – 123］

Zhu CY, Liu H, Cao X, Zhang MX, Ling B, 2014. Effects of ethyl acetate extracts of *Momordica charantia* leaves on metabolizing enzymes in Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Environmental Entomology*, 36(4): 531 – 537.［朱春亚，刘欢，曹溪，张茂新，凌冰，2014. 苦瓜叶萃取物对亚洲玉米螟代谢酶活性的影响. 环境昆虫学报，36(4)：531 – 537］

（责任编辑：赵利辉）